

Д.Д. Елисеева¹, И.А. Завалишин¹, А.В. Караулов², С.Н. Быковская³¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт неврологии» РАМН, Москва² ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова³ ГБОУ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

Роль регуляторных Т-клеток в развитии аутоиммунных нарушений при рассеянном склерозе

В процессах поддержания иммунологической толерантности важная роль принадлежит недавно открытой популяции регуляторных Т-клеток CD4+CD25+FoxP3+ (T-reg). Эти клетки обладают огромным потенциалом в подавлении патологического иммунного ответа, наблюдающегося при различных аутоиммунных заболеваниях, в том числе при рассеянном склерозе. Продemonстрировано снижение числа и функциональной активности T-reg в периферической крови больных рассеянным склерозом в стадии обострения, увеличение их количества при ремиссии заболевания, связь длительности аутоиммунного процесса и степени инвалидизации больных с количеством T-reg. Показана возможность использования выращенных ex vivo T-reg для коррекции иммунопатологических нарушений при рассеянном склерозе.

Ключевые слова: рассеянный склероз, аутоиммунный процесс, регуляторные Т-клетки.

68

Рассеянный склероз (РС) — хроническое аутоиммунное демиелинизирующее заболевание центральной нервной системы (ЦНС), которое возникает вследствие активации аутореактивных Т-клеток, специфичных против компонентов миелина и приводящих к повреждению миелиновой оболочки, олигодендроцитов и аксонов [1]. Рассеянный склероз клинически проявляется множественной (рассеянной) симптоматикой и считается одной из наиболее социально значимых проблем современной неврологии, так как этим заболеванием страдают в большинстве молодые люди, ведущие активную трудовую и социальную деятельность [2].

Рассеянный склероз — мультифакториальное заболевание. Важную роль в его развитии играют вирусная инфекция, наследственная предрасположенность, реализуемая полигенной системой, ответственной за формирование иммунного ответа и определенного типа метаболизма, а также неизвестные пока географические факторы [3].

Гистохимическое изучение очагов поражения (бляшек) в ЦНС, данные иммуногенетики и исследования модели

РС на животных, положительный эффект иммуномодулирующей и иммуносупрессивной терапии дают основание считать, что в основе патогенеза заболевания лежит аутоиммунный механизм, опосредованный CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками [4].

Повреждающему эффекту активированных Т-клеток при РС подвергаются белки миелина: основной белок миелина, миелин-ассоциированный гликопротеин, миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (МОГ), протеолипидный протеин и ганглиозиды мозга. Они и представляют собой аутоантигены [5].

Наиболее полно аутоиммунные процессы выражены на начальных этапах заболевания, когда обострения РС сменяются периодами ремиссий. Последующая хроническая фаза заболевания характеризуется как дегенерацией миелинового волокна, так и разрушением олигодендроцитов и аксонов. Показано, что аксональная нейродегенерация способна развиваться на самых ранних стадиях заболевания, еще до клинических проявлений [6].

Известен ряд механизмов поддержания гомеостаза иммунной системы, в их числе анергия, клональная

D.D. Eliseeva¹, I.A. Zavalishin¹, A.V. Karaulov³, S.N. Bykovskaiy²¹ Research Center of Neurology RAMS, 6 neurological department² Russian State Medical University, Front cell technologies and regenerative medicine³ First Moscow State Medical University I.M. Sechenov, Department of Clinical Immunology and Allergy Summary

The role of regulatory T cells in the development of autoimmune process in multiple sclerosis

In the maintenance of immunological tolerance important role belongs to the recently discovered population of regulatory T-cells CD4 + CD25 + FoxP3 +. These cells have potential in suppressing pathologic immune responses observed at various autoimmune diseases including multiple sclerosis. We have shown a reduction in the number and functional activity of T-reg in peripheral blood of patients with multiple sclerosis in the acute stage, the increase in their number during remission, duration of the relationship of the autoimmune process and the degree of disability of patients with the contents of T-reg. The possibility of using the grown ex vivo T-reg for the correction of immunopathological process in multiple sclerosis.

Key words: multiple sclerosis, autoimmune process, regulatory T-cells.

делеция и активная супрессия Т-регуляторными клетками. В процессе активации, дифференцировки и пролиферации Т-клеток главное значение имеет и нарушение баланса различных субпопуляций Т-клеток, в том числе супрессоров. Так, последнее десятилетие ознаменовалось активным изучением клеток-регуляторов, которые подавляют пролиферацию Т-хелперов и цитотоксических Т-лимфоцитов, ингибируя активность В-клеток, естественных киллеров и моноцитов [7].

Регуляторные Т-клетки CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺ (T-reg)

T-reg были идентифицированы в 1990 г. двумя группами ученых — В.М. Hall с соавт. и S. Sakaguchi с соавт. и позднее охарактеризованы S. Sakaguchi с соавт. [8, 9]. В дальнейшем было установлено, что эти клетки, предотвращающие активацию и пролиферацию потенциально аутореактивных Т-лимфоцитов, играют фундаментальную роль в контроле аутоиммунитета, аллергии и трансплантационной толерантности [10]. T-reg предотвращают не только аутоиммунные расстройства: они, например, контролируют иммунный ответ против вирусов, паразитов, бактерий и дрожжей [11] и предотвращают патологический иммунный ответ на кишечную микрофлору [12]. Наконец, T-reg строго контролируют противоопухолевый иммунитет [13].

Показано, что в процессе нормального постэмбрионального развития Т-рег формируются в тимусе и на 3–4-й день после рождения расселяются в периферические лимфоидные ткани. В периферической крови тимэктомизированных в первые 2–3 дня после рождения мышей эти клетки не обнаруживаются, что ассоциируется с развитием системного аутоиммунного синдрома, включающего гастрит, тиреоидит, оофорит, инсулинозависимый диабет. Эти данные имеют принципиальное значение, поскольку некоторые формы аутоиммунной патологии могут быть предотвращены путем инфузии Т-рег, полученных от нормальных сингенных доноров [9].

Нативные и индуцированные Т-рег. Различают 2 типа Т-рег: нативные и индуцированные. Нативные Т-рег развиваются в тимусе и в последующем расселяются в периферические лимфоидные органы [9]. Индуцированные Т-рег появляются на периферии в результате иммунной стимуляции из клеток CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ или могут быть индуцированы *ex vivo*. Например, ретровирусная трансдукция наивных CD4⁺CD25⁺ Т-клеток фактором Foxp3 может вызывать образование Т-клеток с регуляторной активностью [14].

Специфические маркеры Т-рег. Т-рег представляют минорную субпопуляцию CD4⁺ Т-клеток, на поверхности которых постоянно экспрессируется CD25⁺ (α-цепь рецептора интерлейкина [ИЛ] 2). Хотя CD25⁺ может кратковременно появляться на активированных CD4⁺ Т-лимфоцитах, интенсивность экспрессии этого маркера выше в субпопуляции Т-рег (CD25^{hi}), чем в активированных CD4⁺ Т-клетках (CD25^{low}). ИЛ2 и его рецепторы (R) играют особую роль в активации Т-рег. У трансгенных мышей, дефицитных по ИЛ2 и ИЛ-2R, наблюдается снижение количества Т-рег в тимусе и в периферических лимфоидных органах, что приводит к Т-клеточной гиперпролиферации и развитию аутоиммунной патологии [15].

Другим специфическим маркером Т-рег служит экспрессия гена Foxp3. Для активации, развития и функционирования Т-рег необходима инициация ядерного фактора транскрипции, связанного с Х-хромосомой

(Foxp3), который рассматривается как уникальный мембранный маркер Т-рег [16]. Ярким примером роли гена Foxp3 служит развитие у детей с его мутацией IPEX-синдрома (Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) — синдрома дисрегуляции иммунитета, при котором развиваются полиэндокринопатии; энтеропатии, характеризующиеся полиорганной аутоиммунной патологией (сахарный диабет I типа, аутоиммунный тиреоидит, тяжелая энтеропатия); аллергические проявления; гематологические нарушения (гемолитическая анемия, тромбоцитопения) с высоким уровнем аутоантител и массивной Т-клеточной инфильтрацией кожи и пищеварительного тракта [17].

Другие маркеры Т-рег. Кроме вышеперечисленных специфических маркеров, на поверхности Т-рег экспрессируются эффекторные молекулы, такие как CTLA4 (протеин, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами), LAG3, CD39 и CD73 и костимуляторные молекулы CD28, CD80/CD86 (B7), CD40, OX40, 4-1BB (12–14). Более 95% Т-рег несут на своей поверхности CD62L, а также маркеры клеток памяти. Т-рег, выделенные из периферической крови доноров, экспрессируют CD45RO⁺ (CD45RA), CD45RB^{low}. По большей части Т-рег экспрессируют многие клеточные маркеры, которые выявляются на хронически активированных CD4⁺ Т-клетках. Популяция Т-рег несет также многие иммуномодуляторные поверхностные маркеры, включая главный комплекс гистосовместимости II, CD95 (FAS), GITR (протеиновый рецептор глюкокортикоид-индуцированного фактора некроза опухоли). Отсутствие клеточного поверхностного маркера CD127 (рецептор ИЛ7) служит наилучшим доказательством причастности к популяции Т-рег [18].

Механизмы действия Т-рег. Механизмы действия Т-рег на клетки мишени не до конца изучены. Имеются данные о том, что в механизмах супрессии могут участвовать ИЛ10, трансформирующий фактора роста β (TGFβ), антиген-4 цитотоксических Т-лимфоцитов (CTLA4) и ИЛ35 [19].

После стимуляции антигеном Т-рег экспрессируют на клеточной поверхности высокий уровень TGFβ, который, как предполагают, опосредует иммуносупрессорный эффект через межклеточные контакты с отвечающими на антиген Т- и В-клетками. Деpletion TGFβ нейтрализующими антителами приводит к подавлению функции Т-рег и у мыши, и у человека. У мышей, дефицитных по TGFβ, развиваются спонтанные аутоиммунные заболевания в возрасте 4–5 недель, а также наблюдается дисрегуляция иммунного воспалительного ответа, который проявляется после удаления CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток. Эффект TGFβ может быть направлен и на подавление функции эффекторных Т-клеток, и на регуляцию дифференцировки Т-хелперов 1 типа (Th1) и Т-хелперов 17 (Th17) [20].

ИЛ10 — гомодимерный цитокин с широким спектром ингибиторной активности. Известно, что Т-рег сами секретируют ИЛ10. Данный факт подтверждается тем, что добавление антител к ИЛ10 отменяет супрессорный эффект Т-рег, введенных для поддержания приживления кожного аллотрансплантата [21]. В другой серии экспериментов было установлено, что Т-рег, полученные от трансгенных мышей с выключенным геном ИЛ10, теряют способность подавлять аутоиммунное воспаление кишечника или иммунный ответ к лейшмании [22].

В модели экспериментального аллергического энцефаломиелита (ЭАЭ) у мышей, дефицитных по ИЛ10, развивается обострение заболевания и, напротив, уси-

ление продукции ИЛ10 Т-reg-клетками ассоциируется с фазой ремиссии [23]. Как было показано R.K. Selvaraj и T.L. Geiger, перенос Т-reg, выделенных из периферической крови или индуцированных *ex vivo*, предотвращает развитие ЭАЭ через продукцию ИЛ10. Аналогично TGF_{β} ИЛ10 может также участвовать в генерации индуцированных Т-reg [24].

Недавно был открыт ИЛ35, который принимает участие в осуществлении супрессорной функции Т-reg. ИЛ35 — гетеродимер, состоящий из 2 цепей, ИЛ12/p35 (ИЛ12) и Еbi3 (ИЛ27). ИЛ35 подавляет пролиферацию обычных Т-клеток, стимулированных анти-CD3-антителами, и активируется для потенцирования максимальной регуляторной функции *in vitro* и *in vivo* [25].

В многочисленных экспериментах *in vitro* взаимодействие Т-reg и активированных клеток-мишеней ($CD4^{+} CD25^{-}$ и $CD8^{+}$) изучали с использованием полупроницаемой мембраны, которая разделяет эти две субпопуляции клеток. Опыты показали, что Т-reg неспособны подавлять пролиферацию обычных стимулированных Т-клеток, если они находятся в разных компартментах с клетками-мишенями [26]. Эти данные привели к заключению, что Т-reg осуществляют только контакт-зависимую супрессию. Однако недавно было показано, что ИЛ35 активируется для потенцирования максимальной регуляторной функции. Сокультивирование Т-reg с обычными Т-клетками в одном компартменте подавляет пролиферацию Т-клеток мишеней в другом компартменте, отделенном полупроницаемой мембраной за счет секреции ИЛ35, так как антитела, нейтрализующие ИЛ35, отменяют эту ингибицию [25].

В исследованиях G. Borsellino с соавт. получено, что только на субпопуляции нативных Т-reg может экспрессироваться CD39. Молекула CD39 выступает мембранной АТФ-азой, катализирующей совместно с CD73 превращение внеклеточного аденозинтрифосфата (АТФ) в аденозин. Связывание аденозина с его A2A-рецептором, который находится на эффекторных Т-клетках, приводит к увеличению внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата и подавлению функции этих клеток. У мышей, дефицитных по CD39-/-, отмечалась реакция отторжения аллотрансплантата [27].

О роли CTLA4 свидетельствует тот факт, что у трансгенных мышей, дефицитных по CTLA4, развиваются тяжелые лимфопролиферативные расстройства: мыши погибают от поражения, связанного с неконтролируемым аутоиммунным процессом в органах. При этом введение антител к CTLA4 подавляет развитие аутоиммунного процесса в экспериментальных моделях рассеянного склероза и инсулинозависимого сахарного диабета [28]. Кроме того, в опытах *in vitro* показано, что Т-reg подавляют антиген-специфическую и поликлональную пролиферацию других Т-клеток, однако блокада CTLA4 отменяет супрессию. Можно полагать, что CTLA4 является ключевой коstimуляторной молекулой при активации Т-reg, которая осуществляет супрессию и контроль над аутореактивными Т-клетками. Цитотоксический эффект Т-reg связан также с активацией гранзимы В и перфорин-зависимым механизмом [29].

Отличительные особенности Т-reg. Т-reg неспецифичны, эти клетки имеют поликлональный репертуар Т-клеточного рецептора (ТКР), основанного на разнообразии экспрессии генов различных элементов ТКР — α/β , и могут распознавать широкий спектр своих и чужих антигенов [29]. При этом свежeweделенные Т-reg **анергичны** и не могут отвечать на стимуляцию Т-клеточного рецептора. Т-reg способны пролиферировать только

в присутствии ИЛ2 и при активации подавляют пролиферацию как наивных $CD4^{+}$ и $CD8^{+}$ Т-клеток, так и эффекторных $CD4^{+}CD25^{-}$ Т-клеток, цитотоксических $CD8^{+}$ Т-клеток памяти, а также В-лимфоцитов, натуральных киллеров и моноцитов [7].

Т-reg — **долгоживущая субпопуляция** Т-клеток. Они могут длительное время выживать без деления вне контакта со специфическим антигеном. Такие клетки экспрессируют L-селектин и циркулируют как наивные Т-лимфоциты. Они могут оседать в лимфоузлах, а при контакте со своим антигеном начать пролиферировать. При этом Т-reg эффективно угнетают иммунный ответ и препятствуют выходу эффекторных Т-клеток в очаг воспаления, снижая экспрессию их хемокиновых рецепторов [30].

Значение Т-reg при аутоиммунных заболеваниях.

В последние годы получены многочисленные сведения о роли Т-reg в патогенезе аутоиммунных заболеваний, при которых количество и супрессорная функция этих клеток значительно снижены. Это такие тяжелые заболевания, как ревматоидный артрит [31], системная красная волчанка [32], бронхиальная астма [33], псориаз [34], атопический дерматит [35], сахарный диабет 1-го типа [36], миастения гравис [37].

У некоторых пациентов процент Т-reg в периферической крови может быть не изменен по сравнению со здоровыми донорами, однако у таких больных имеет место снижение Т-регуляторной функции, нарушенной вследствие дефекта гена Foxp3, ответственного за возникновение заболевания. Помимо аутоиммунных заболеваний у пациентов, страдающих аллергией, также наблюдается дисфункция Т-reg, не способных подавлять ответ Th2 [38].

Роль Т-reg в индукции экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ)

Роль Т-reg в предотвращении аутоагрессии Т-клеток против структур ЦНС продемонстрирована в ряде исследований на животных с ЭАЭ. Показано, что адаптивный перенос Т-reg из периферических лимфатических узлов наивных мышей может редуцировать распространение и тяжесть ЭАЭ у мышей-реципиентов линии C57Bl/6 и линии SJL [39]. В исследованиях Y. Matsumoto с соавт. периферические Т-reg, выделенные от мышей с ЭАЭ, подавляли развитие хронической ЭАЭ у реципиентов крыс, что говорит об отсутствии специфичности Т-reg [40].

McGeachy с соавт. показали, что МОГ-индуцированный ЭАЭ протекает заметно легче у мышей, которым ввели небольшое количество Т-reg, выделенных из ЦНС мышей, находящихся в стадии реконвалесценции. Интересно, что такое же количество Т-reg, взятое у тех же мышей из лимфатических узлов, не давало положительного эффекта. Это наблюдение показывает, что антиген-специфические Т-reg, которые были выделены из ткани-мишени (то есть из ЦНС), обладают более высокой супрессорной активностью, чем клетки, выделенные из других тканей, например из лимфоузлов. В результате инактивации или удаления Т-reg у C57Bl/6 мышей, которым ввели анти-CD25-моноклональные антитела, увеличивается восприимчивость к ЭАЭ и снижается резистентность к реиндукции ЭАЭ. Элиминация Т-reg предотвращает наступление ремиссии ЭАЭ у мышей линии SJL [41].

Миелин-специфические Т-reg способны мигрировать и накапливаться в месте воспаления в ЦНС животных

с ЭАЭ [42]. Отмечено, что уровень T-reg, содержащихся в ЦНС, коррелирует со стадией выздоровления ЭАЭ [41, 42]. Однако этих клеток недостаточно для угнетения функции энцефалитогенных Т-эффекторных клеток в период обострения ЭАЭ. Некоторыми исследователями предпринимались попытки увеличения числа T-reg *in vivo* для подавления текущих аутоиммунных процессов в моделях ЭАЭ. В вышеперечисленных экспериментах показано, что дополнительное увеличение количества T-reg улучшает течение патологического процесса [42].

Таким образом, опытным путем установлено, что отсутствие или недостаточное количество T-reg приводит к развитию ЭАЭ у трансгенных животных, а перенос определенного количества T-reg либо ведет к выздоровлению животных, либо к снижению тяжести аутоиммунного процесса. Инъекции T-reg не вызывают каких-либо побочных явлений, местных реакций, даже при переносе клеток от разных классов животных, что подтверждает неспецифический эффект этих клеток [43].

Изучение роли T-reg у больных рассеянным склерозом
Изменения функции и количества T-reg может служить объяснением несбалансированной устойчивости к ауто-антигенам, что приводит к изменениям в аутоиммунитете, развитию и прогрессированию болезни.

При сопоставлении стадии обострения и ремиссии заболевания V. Vigiotta с соавт. выявили значимо низкий уровень T-reg в активной фазе РС и впервые показали дефект функциональной активности T-reg [44]. Далее Huan с соавт. провели первое исследование, определившее снижение уровня Foxp3 на периферических T-reg у пациентов с РС, и предположили, что именно изменение этого показателя лежит в основе нарушения иммунорегуляторных механизмов при РС [45].

В работе J. Naas с соавт. показано снижение ингибиторного эффекта T-reg-больных на пролиферацию антиген-специфических Т-клеток, индуцированных человеческим рекомбинантным миелолигандом, так же, как и на иммунный ответ, полученный за счет поликлональной и аллогенной стимуляции по сравнению со здоровыми донорами. Этот эффект был постоянным и не зависел от устойчивости респондентных Т-клеток. Авторы также определили, что количество T-reg было одинаково распределено между кровью и цереброспинальной жидкостью больных РС [46]. В более поздних исследованиях этих авторов выявлено снижение супрессорных функций T-reg в крови больных РС вследствие изменения гомеостаза и нарушенного высвобождения T-reg из тимуса. Авторы выявили сниженное количество нативных T-reg, которые экспрессируют на своей мембране гликопротеид CD31 (PECAM1) и являются Т-лимфоцитами, недавно покинувшими тимус (recent thymic emigrants — RTEs-T-reg). У подобных пациентов уменьшение уровня RTEs-T-reg совпадает с сокращенным V β -репертуаром Т-клеточного рецептора и согласуется с нарушением клональной экспансии T-reg. По их мнению, снижение уровня RTEs компенсируется за счет увеличения количества индуцированных T-reg, находящихся на периферии, и в результате этого стабилизируется баланс нативных и индуцированных T-reg [47]. Другая группа авторов показала, что функциональный дефект T-reg может быть связан с низким уровнем экспрессии мРНК ИЛ10 [48].

Большой вклад в изучение T-reg при РС внесли K. Venken с соавт. В их первых исследованиях были изучены образцы крови пациентов с РС в стадии ремиссии, больных вторично-прогредиентным РС и здоровых доноров. Часть пациентов с РС во время забора

крови получала лечение IFN- β 1a (Ребиф). По их данным, число T-reg достоверно не отличалось при разных типах течения заболевания и не зависело от проводимой иммуномодулирующей терапии. Однако у больных РС имело место значительное снижение супрессорной функции T-reg и экспрессии гена Foxp3 по сравнению с больными, страдающими вторично-прогредиентным течением РС и здоровыми донорами. У пациентов, получающих IFN- β 1a отмечался меньший дефект функции T-reg [49].

Позднее было продемонстрировано снижение числа T-reg у пациентов с РС в стадии обострения. Была выявлена корреляция между низким количеством T-reg и снижением уровня экспрессии Foxp3, что, по мнению авторов, является причиной функционального дефекта T-reg у этих больных. Кроме того, при исследовании группы больных РС показано, что содержание T-reg достоверно выше в цереброспинальной жидкости, чем в периферической крови этих же пациентов. Для дальнейшего изучения функции T-reg исследователи выделили 2 группы больных РС. В одной группе время от начала заболевания составило менее 10 лет, в другой — более 10 лет. Авторы отметили снижение числа и больший функциональный дефект T-reg у пациентов с меньшей продолжительностью аутоиммунного процесса [50]. В 2007 г. U. Feger с соавт. описана популяция T-reg, экспрессирующих HLA-G (человеческий лейкоцитарный антиген-G) [51]. У больных РС снижение количества CD4⁺ и CD8⁺ HLA-G-экспрессирующих клеток коррелирует с увеличением риска послеродового обострения заболевания у женщин [52].

J.M. Fletcher с соавт. выявили дефицит регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, коэкспрессирующих маркер CD39. Исследователи установили, что T-reg с данным фенотипом способны подавлять продукцию ИЛ17 [53].

T-reg могут аккумулироваться и проявлять свои противовоспалительные свойства непосредственно в месте паренхиматозного воспаления. У больных РС выявляются количественные преобладание T-reg в цереброспинальной жидкости, особенно при обострении процесса. Некоторые авторы полагают, что эти результаты могут быть связаны с увеличением миграции T-reg из крови в место воспаления при РС или могут отражать *de novo* поколения T-reg в участке повреждения ЦНС [51]. Подобные результаты получены при ревматоидном артрите и ювенильном диабете, где продемонстрировано скопление супрессорных T-reg в органах-мишенях [54].

В некоторых исследованиях оценивался эффект лечения пациентов с РС на количество и функцию T-reg. Например, показано, что применение IFN- β 1-a увеличивает число и функциональную активность T-reg у больных РС в стадии ремиссии [55]. У пациентов, получающих глатирамера ацетат, содержание и супрессорная активность T-reg достоверно выше по сравнению с больными, не принимающими подобного лечения [56]. Через 6 недель после проведенной пульс-терапии метилпреднизолоном (1 г/сут в течение 3 дней) значительно повышается процент T-reg и экспрессия гена Foxp3 у больных РС [57].

Для того, чтобы уточнить роль в развитии аутоиммунного процесса и определить связь количества и функциональной активности T-reg с клинической картиной РС, мы провели исследование периферической крови у 52 больных РС в стадии обострения и показали, что количество T-reg снижено в 2,3 раза по сравнению с группой здоровых доноров. Далее, чтобы проверить, изменяется ли содержание T-reg в зависимости

от степени выраженности процесса, мы изучили иммунофенотип клеток крови одной и той же группы больных в стадии обострения и ремиссии. Мы впервые показали, что в стадии обострения количество Т-рег снижено более чем в 2 раза, тогда как в стадии ремиссии их содержание увеличивается и достигает уровня нормы. Далее мы впервые провели сопоставление между показателями тяжести заболевания и уровнем Т-рег в крови больных. Результаты продемонстрировали очевидную обратную зависимость между числом Т-рег и степенью инвалидизации больных. Нами показано, что больший количественный дефицит Т-рег выявляется у длительно болеющих пациентов. Функциональная активность Т-рег, выделенных из периферической крови больных РС, также существенно снижена.

Таким образом, в последние годы накоплены убедительные данные о том, что Т-рег контролируют периферический иммунный ответ и играют центральную роль в определении тяжести клинического течения аутоиммунных заболеваний, в том числе и РС.

Индукция Т-рег человека *ex vivo*

Известно, что полученные *ex vivo* клетки стабильны, долго живут, обладают супрессорными свойствами, неспецифичны и неиммуногенны. Практически имеется возможность выделить и индуцировать большие количества этих клеток для *in vitro* манипуляций, размножить их без потери функции и ввести в периферические участки тела с уверенностью, что они будут мигрировать в анатомический очаг воспаления, что требуется для осуществления их оптимальной функции. Существует несколько методов *ex vivo* экспансии Т-рег: повторяющаяся стимуляция Т-рег анти-CD3 и анти-CD28 в присутствии антигенпрезентирующих клеток и ИЛ2, а также культивирование выделенных Т-рег с аутологичными дендритными клетками с добавлением ИЛ2 [58].

Нами разработана методика культивирования аутологичных Т-рег больного, при которой Т-клетки CD4⁺,

выделенные методом магнитной селекции, генерируют в течение 7–8 дней. Выращенные *ex vivo* клетки CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ по фенотипическим и функциональным характеристикам полностью идентичны нативным Т-рег, выделенным из периферической крови пациента, однако их количество после экспансии возрастает в 60–200 раз. Полученные данные позволяют использовать Т-рег-клетки для адаптивной иммунотерапии аутоиммунных заболеваний, в том числе и РС. Для подтверждения данного предположения мы провели трансплантацию аутологичных Т-рег 5 больным РС. Через 2 недели после введения Т-рег (в среднем $275,13 \pm 60,78 \times 10^7$) больным подкожно мы получили увеличение содержания клеток в периферической крови с $0,6 \pm 0,0019$ до $1,22 \pm 0,0033\%$, соответственно. При этом увидели и улучшение клинической картины: если до введения регуляторных Т-клеток CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ средний балл по шкале EDSS (расширенная шкала инвалидизации) составлял $2,9 \pm 0,25$, то после проведенной трансплантации снизился до $1,9 \pm 0,25$, причем у пациентов не наблюдалось никаких побочных реакций. При наблюдении за пациентами в течение года только у одного больного через 9 месяцев после проведения трансплантации Т-рег выявлено обострение заболевания. Состояние остальных больных оставалось стабильным как клинически, так и по данным магнитно-резонансной томографии.

Таким образом, не вызывает сомнения, что Т-рег играют важную роль в поддержании иммунологической толерантности при аутоиммунном процессе. Снижение количества и функциональной активности Т-рег у больных РС можно использовать как диагностический показатель наступающего обострения, а повышение их количества рассматривать как прогностический тест формирования ремиссии. Т-рег можно выделить из периферической крови больного и вырастить в лабораторных условиях такое количество клеток, которое способно компенсировать их дефицит в организме и, соответственно, применяться с терапевтической целью.

REFERENCES

1. Zavalishin I.A., Golovkin V.I. Rasseyannyy skleroz. Izbrannyye voprosy teorii i praktiki. Moskva. 2000. 637 s.
2. Gusev E.I., Boiko A.N., Zavalishin I.A. Epidemiologicheskoe issledovanie rasseyannogo skleroza. Metodicheskie rekomendatsii MZ RF № 2003/82. Moskva. 2003. 80 s.
3. Gusev E.I., Boiko A.N. Rasseyannyy skleroz: dostizheniya desyatletiya. *Jurn. nevrol. i psikiatrii*. Spec. vypusk «Rasseyannyy skleroz». 2007; 4: 4–13.
4. Fletcher J.M., Lalor S.J., Sweeney C.M. et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 2010; 162 (1): 1–11.
5. Kerschensteiner M., Misgeld T. Cellular imaging in the nervous system. *Dtsch Med Wochenschr*. 2007; 132 (47): 2529–2533.
6. Merkulov Yu.A., Zavalishin I.A., Merkulova D.M. Rol' aksonopatii v mekhanizmah razvitiya demieliniziruyuschiykh processov v central'noi i perifericheskoi nervnoi sisteme. *Jurn. nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2007; 3: 26–30.
7. Jiang S., Lechler R.I., He X.S., Huang J.F. Regulatory T cells and transplantation tolerance. *Hum Immunol*. 2006; 67 (10): 765–776.
8. Hall B.M., Pearce N.W., Gurley K.E., Dorsch S.E. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4⁺ suppressor cell and its mechanisms of action. *J. Exp. Med*. 1990; 171: 141–157.
9. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M. et al. Immunologic self-tolerances maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol*. 1995; 155 (3): 1151–1164.
10. Nasonov E.L., Bykovskaya S.N. T-regulyatornye клетки pri avtoimunnykh revmaticheskikh zabolevaniyakh. *Vestnik RAMN*. 2006; 9–10: 74–82.
11. Vorob'ev A.A., Bykovskaya S.Yu., Pashkov E.P., Bykov A.S. Rol' kletok-regulyatorov CD4⁺CD25⁺ v razvitiy hronicheskikh infektsionnykh zabolevaniy. *Vestnik RAMN*. 2006; 9–10: 24–29.
12. Piccirillo C.A., Shevach E.M. Naturally-occurring CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T-cells: central players in the arena of peripheral tolerance. *Semin Immunol*. 2004; 16 (2): 81–88.
13. Fourcade J., Sun Z., Kudela P. et al. Human tumor antigen-specific helper and regulatory T-cells share common epitope specificity but exhibit distinct T-cell repertoire. *J Immunol*. 2010; 184 (12): 6709–6718.
14. Hori S., Takahashi T., Sakaguchi S. Control of autoimmunity by naturally arising regulatory CD4⁺ T-cells. *Adv Immunol*. 2003; 81: 331–371.
15. Sanchez J., Casano J., Alvarez M.A. et al. Kinetic of regulatory CD25 high and activated CD134⁺ (OX40) T lymphocytes during

- acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol.* 2004; 126 (5): 697–703.
16. Walker M.R., Kasprlowicz D.J., Gersuk V.H. et al. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T-cells. *J Clin Invest.* 2003; 112 (9): 1437–1443.
 17. Gambineri E., Torgerson T.R., Ochs H.D. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003; 15 (4): 430–435.
 18. Vignali D.A., Collison L.W., Workman C.J. How regulatory T-cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8 (7): 523–532.
 19. Roncarolo M.G., Battaglia M., Gregori S. The role of interleukin 10 in the control of autoimmunity. *J Autoimmun.* 2003; 20 (4): 269–272.
 20. Li M.O., Wan Y.Y., Flavell R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T-cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity.* 2007; 26 (5): 579–591.
 21. Kingsley C.I., Karim M., Bushell A.R., Wood K.J. CD25+CD4+ regulatory T-cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol.* 2002; 168 (3): 1080–1086.
 22. Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M. et al. CD4+CD25+ regulatory T-cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature.* 2002; 420 (6915): 502–507.
 23. Mosser D.M., Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008; 226: 205–218.
 24. Selvaraj R.K., Geiger T.L. Mitigation of experimental allergic encephalomyelitis by TGF-beta induced Foxp3+ regulatory T lymphocytes through the induction of anergy and infectious tolerance. *J Immunol.* 2008; 180 (5): 2830–2838.
 25. Collison L.W., Pillai M.R., Chaturvedi V., Vignali D.A. Regulatory T-cell suppression is potentiated by target T-cells in a cell contact, IL-35- and IL-10-dependent manner. *J Immunol.* 2009; 182 (10): 6121–6128.
 26. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S. et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T-cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med.* 2000; 192 (2): 303–310.
 27. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D. et al. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3+ T-reg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood.* 2007; 110 (4): 1225–1232.
 28. Luhder F., Hoglund P., Allison J.P. et al. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) regulates the unfolding of autoimmune diabetes. *J Exp Med.* 1998; 187 (3): 427–432.
 29. Toda A., Piccirillo C.A. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T-cells. *J Leukoc Biol.* 2006; 80 (3): 458–470.
 30. Fu S., Zhang N., Yopp A.C., Chen D. et al. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant.* 2004; 4 (10): 1614–1627.
 31. Pohlers D., Beyer A., Koczan D. et al. Constitutive upregulation of the transforming growth factor-beta pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther.* 2007; 9 (3): R59.
 32. Lyssuk E.Y., Torgashina A.V., Soloviev S.K., Nassonov E.L. Reduced number and function of CD4+CD25 high FoxP3+ regulatory T-cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol.* 2007; 601: 113–119.
 33. Xu Y.Q., Gao Y.D., Yang J., Guo W. A defect of CD4+CD25+ regulatory T-cells in inducing interleukin-10 production from CD4+ T-cells under CD46 costimulation in asthma patients. *J Asthma.* 2010; 47 (4): 367–373.
 34. Sugiyama H., Gyulai R., Toichi E. et al. Dysfunctional blood and target tissue CD4+CD25 high regulatory T-cells in psoriasis: mechanism underlying unrestrained pathogenic effector T-cell proliferation. *J Immunol.* 2005; 174 (1): 164–173.
 35. Verhagen J., Akdis M., Traidl-Hoffmann C. et al. Absence of T-regulatory cell expression and function in atopic dermatitis skin. *J Allergy Clin Immunol.* 2006; 117 (1): 176–183.
 36. DeJaco C., Duftner C., Grubeck-Loebenstein B., Schirmer M. Imbalance of regulatory T-cells in human autoimmune diseases. *Immunology.* 2006; 117 (3): 289–300.
 37. Balandina A., Lecart S., Darteville P. et al. Functional defect of regulatory CD4(+)CD25+ T- cells in the thymus of patients with autoimmune myasthenia gravis. *Blood.* 2005; 105 (2): 735–741.
 38. Grindebacke H., Wing K., Andersson A.C., Suri-Payer E. Defective suppression of Th2 cytokines by CD4CD25 regulatory T-cells in birch allergies during birch pollen season. *Clin Exp Allergy.* 2004; 34 (9): 1364–1372.
 39. Zhang X., Reddy J., Ochi H. et al. Recovery from experimental allergic encephalomyelitis is TGF-beta dependent and associated with increases in CD4+LAP+ and CD4+CD25+ T-cells. *Int Immunol.* 2006; 18 (4): 495–503.
 40. Matsumoto Y., Sakuma H., Kohyama K., Park I.K. Paralysis of CD4(+)CD25(+) regulatory T- cell response in chronic autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2007; 187 (1–2): 44–54.
 41. McGeachy M.J., Stephens L.A., Anderson S.M. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol.* 2005; 175 (5): 3025–3032.
 42. Korn T., Anderson A.C., Bettelli E., Oukka M. The dynamics of effector T-cells and Foxp3+ regulatory T-cells in the promotion and regulation of autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2007; 191 (1–2): 51–60.
 43. Beyersdorf N., Gaupp S., Balbach K. et al. Selective targeting of regulatory T-cells with CD28 superagonists allows effective therapy of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2005; 202 (3): 445–455.
 44. Viglietta V., Baercher-Allan C., Weiner H.L., Haefler D.A. Human CD4+CD25+ regulatory T- cells *J Exp Med.* 2004; 199 (7): 971–972.
 45. Huan J. Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients. *J Neurosci Res.* 2005; 81: 45–52.
 46. Haas J., Hug A., Viehove A. et al. Reduced suppressive effect of CD4+CD25high regulatory T- cells on the T-cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2005; 35: 3343–3352.
 47. Haas J., Fritzsche B., Trubswetter P. et al. Prevalence of newly generated naive regulatory T- cells (T-reg) is critical for T-reg suppressive function and determines T-reg dysfunction in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2007; 179 (2): 1322–1330.
 48. Martinez-Forero I., Garcia-Munoz R., Martinez-Pasamar S. et al. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1-cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 2008; 38 (2): 576–586.
 49. Venken K., Hellings N., Hensen K. et al. Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4+CD25+ regulatory T-cell function and FOXP3 expression. *J Neurosci Res.* 2006; 83 (8): 1432–1446.
 50. Venken K., Hellings N., Thewissen M. et al. Compromised CD4+CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. *Immunology.* 2008; 123 (1): 79–89.
 51. Feger U. HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation. *Blood.* 2007; 110: 568–577.
 52. Airas L., Saraste M., Rinta S. et al. Immunoregulatory factors in multiple sclerosis patients during and after pregnancy: relevance of natural killer cells. *Clin Exp Immunol.* 2008; 151 (2): 235–243.
 53. Fletcher J.M., Lonergan R., Costelloe L. et al. CD39+Foxp3+ regulatory T-cells suppress pathogenic Th17 cells and are impaired in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2009; 183 (11): 7602–7610.
 54. Baecher-Allan C., Hafler D.A. Human regulatory T-cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006; 212: 203–216.

55. de Andres C., Aristimuno C., de Las Heras V. et al. Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2007; 182 (1–2): 204–211.
56. Saresella M., Marventano I., Longhi R. et al. CD4+CD25+FoxP3+PD1-regulatory T-cells in acute and stable relapsing-remitting multiple sclerosis and their modulation by therapy. *FASEB J.* 2008; 22 (10): 3500–3508.
57. Braitch M., Harikrishnan S., Robins R.A. et al. Glucocorticoids increase CD4CD25 cell percentage and Foxp3 expression in patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand.* 2009; 119 (4): 239–245.
58. Allan S.E., Song-Zhao G.X., Abraham T. et al. Inducible reprogramming of human T-cells into T-reg cells by a conditionally active form of FOXP3. *Eur J Immunol.* 2008; 38 (12): 3282–3289.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Елисеева Дарья Дмитриевна, кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории клинических исследований, врач-невролог 6-го неврологического отделения ФГБУ «НЦН» РАМН

Адрес: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80

Тел.: (495) 490-24-13, факс: (495) 490-28-73

E-mail: ddeliseeva@gmail.com

Завалишин Игорь Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, руководитель 6-го неврологического отделения ФГБУ «НЦН» РАМН

Адрес: 125367, Москва, Волоколамское шоссе, д. 80

Тел.: (495) 490-21-55, факс: (495) 490-28-73

E-mail: gotdelen@gmail.com

Караулов Александр Викторович, доктор медицинских наук, чл.-корр. РАМН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии факультета послевузовского профессионального образования ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова»

Адрес: 119435, Москва, ул. Б. Пироговская д. 2, к. 6

Тел.: (495) 395-64-97

E-mail: drkaraulov@mail.ru

Быковская Светлана Нюневна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая Отделом клеточных технологий и регенеративной медицины Российского национального исследовательского медицинского университета (РНИМУ) им. Н.И. Пирогова

Адрес: 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1

Тел.: (495) 434-14-44

E-mail: sbykovskaia@gmail.com